

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Monika Zahradníková

STANOVENÍ INTRABUNĚČNÉ KONCENTRACE
SUKCINÁTU POMOCÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE
S HMOTNOSTNÍ DETEKCÍ

Determination of intracellular concentration of succinate by liquid
chromatography with mass spectrometric detection

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Martin Štícha, Ph.D.

Praha 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 8. ledna 2020

podpis

Poděkování

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování RNDr. Martinu Štíchovi, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost, trpělivost a cenné rady při měření a zpracování této bakalářské práce.

Abstrakt

Kyselina jantarová a především její aniont sukcinát zaujímá klíčové postavení v metabolismu jako intermediát citrátového cyklu. Zároveň se však účastní i širokého spektra dalších procesů, například jako signální molekula. V této práci byla optimalizována citlivá metoda stanovení kyseliny jantarové v biologických vzorcích pomocí LC-ESI/MS. Derivatizace za přítomnosti trimethylsilyl chloridu zahrnuje in situ generaci HCl, která katalyzuje esterifikaci s benzylalkoholem.

Klíčová slova

kyselina jantarová, sukcinát, hmotnostní spektrometrie, ionizace elektrosprejem, kapalinová chromatografie, LC-ESI/MS, TMS-Cl

Abstract

Succinic acid and its anion succinate occupy a key position in metabolism as an intermediate of the citric acid cycle. Succinate also participates in a broader spectrum of other processes, for example as a signaling molecule. In this work, a sensitive method for quantification of succinic acid in biological samples by LC-ESI/MS was optimized. Derivatization in the presence of trimethylsilyl chloride includes HCl generation in situ which catalyzes esterification with benzyl alcohol.

Key words

succinic acid, succinate, mass spectrometry, electrospray ionization, liquid chromatography, LC-ESI/MS, TMS-Cl

Seznam zkratek a symbolů

4-APEBA	(2-(4-aminophenoxy)ethyl)(4-bromophenethyl)-dimethylammonium bromid
4-BNMA	4-brom-N-methylbenzylamin
ADP	adenosindifosfát
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
ATP	adenosintrifosfát
CoA	koenzym A
CoQ	koenzym Q
DAD	detektor s diodovým polem
EDC	1-ethyl-3-dimethylaminopropyl karbodiimid
ESI	ionizace elektrosprejem
FT-ICR	iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
GDP	guanosindifosfát
GC	plynová chromatografie
GTP	guanosintrifosfát
HIF1 alfa	hypoxií indukovaný transkripční faktor 1 alfa
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
IL1 beta	interleuktin 1 beta
LC	kapalinová chromatografie
m	hmotnost
MPEA	N-methyl 2-fenylethanamin
MS	hmotnostní spektrometrie
o-BHA	o-benzylhydroxylamin
QqTOF	průletový analyzátor s kvadrupólem
TMS-Cl	trimethylsilyl chlorid
TOF	průletový analyzátor
UV	ultrafialové záření
z	náboj

Obsah

1 Cíl práce.....	7
2 Teoretická část.....	8
2.1 Sukcinát – aniont kyseliny jantarové.....	8
2.1.1 Mitochondrie.....	9
2.1.2 Citrátový cyklus	9
2.1.3 Význam a funkce sukcinátu v organismu.....	9
2.1.4 Další sledované parametry.....	13
2.2 Metody stanovení sukcinátu.....	14
2.3 Derivatizace.....	15
2.4 Hmotnostní spektrometrie.....	18
2.4.1 Ionizace elektrosprejem.....	18
2.4.2 Vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie.....	18
2.4.3 Hybridní přístroje.....	20
3 Experimentální část.....	21
3.1 Seznam použitých chemikálií.....	21
3.2 Přístroje, programy.....	21
3.3 Postup.....	22
3.4 Podmínky měření.....	23
4 Výsledky a diskuze.....	24
5 Závěr.....	29
6 Použitá literatura.....	30

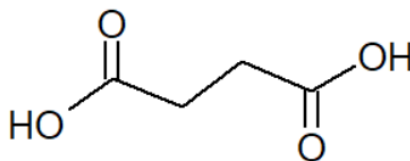
1 Cíl práce

Cílem této práce je optimalizace citlivé metody pro stanovení kyseliny jantarové v biologických vzorcích pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem a částečná identifikace vedlejších produktů.

2 Teoretická část

2.1 Sukcinát – aniont kyseliny jantarové

Kyselina jantarová, systematickým názvem kyselina butandiová, vzorec $C_4H_6O_4$, strukturní vzorec na obrázku 1, je bílá krystalická látka bez zápachu s výraznou kyselou chutí. Její molární hmotnost je $118,09 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, aciditní disociační konstanty jsou $pK_{a1} = 4,21$ a $pK_{a2} = 5,72$. Rozpustnost kyseliny jantarové ve vodě je $100 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a v methanolu $158 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. [1]. Uplatnění této nasycené dikarboxylové kyseliny je velmi široké. V potravinářském průmyslu se používá jako aditivum a součást dochucovadel, dále nachází uplatnění při výrobě čisticích prostředků jako povrchově aktivní látka a pěnicí činidlo. Lze ji využít i jako chelatační činidlo, případně jako odmrazovač v leteckém průmyslu a ve farmaceutickém průmyslu jakou součást léčiv i potravinových doplňků [2].



Obrázek 1: strukturní vzorec kyseliny jantarové

Obzvlášť zajímavá a významná je však její role v živých organismech, ve kterých se vzhledem k tomu, že ve vodném prostředí je snadno rozpustná a ochotně ionizuje, vyskytuje ve formě aniontu - sukcinátu. Sukcinát je především metabolitem produkovaným v mitochondriích během citrátového cyklu, působit ale může i v cytoplazmě a extracelulárním prostoru. Podstatnou funkcí sukcinátu je funkce signální molekuly [3]. Mnohé z pochodů, kterých se sukcinát účastní, probíhají odlišně za normálních a patologických podmínek, jejich studium tedy může napovědět mnohé o stavu a prognóze pacienta [4].

2.1.1 Mitochondrie

Mitochondrie jsou semiautonomní organely tvořící energetické centrum eukaryotických buněk, jejich hlavní význam je syntéza ATP. V buňkách se mitochondrií vyskytují stovky až tisíce, nejvíce v buňkách s vysokou metabolickou aktivitou, které tvoří například játra, ledviny nebo srdeční sval. Některé specializované buňky, například červené krvinky, mitochondrie nemají. Základní struktura mitochondrie je složena z vnější membrány, zřasené vnitřní membrány s velkým povrchem tvořící křisty a z matrixu, který mitochondrii vyplňuje. Drtivá většina proteinů mitochondrií je enzymatického původu. V matrixu jsou rozpuštěné enzymy mimo jiné katalyzující reakce katabolických drah – oxidace pyruvátu, citrátový cyklus a beta-oxidace mastných kyselin. Velký povrch vnitřní membrány umožňuje ukotvení enzymů, především těch, které katalyzují reakce dýchacího řetězce a oxidační fosforylaci [5] [6].

2.1.2 Citrátový cyklus

Konečným společným metabolitem trávení, enzymově řízené hydrolýzy, všech základních živin i zásobních látek je acetyl-SCoA, který je dále odbouráván v citrátovém cyklu. Sukcinát zde vzniká jako meziprodukt citrátového cyklu ze sukcinyl-CoA za katalýzy sukcinyl-CoA-synthetasou. Reakce patří mezi substrátové fosforylace, vzniká ATP z ADP nebo GTP z GDP. Sukcinát je dále pomocí enzymu sukcinát-dehydrogenasy převeden na fumarát [7].

Citrátový cyklus je nedílnou součástí katabolismu všech aerobních chemoorganotrofních organismů. Vznikající aktivní vodík, tedy vodík převáděný pomocí nukleotidových kofaktorů, je dále využit pro získání energie v dýchacím řetězci při buněčném dýchání. Oba tyto procesy probíhají u eukaryotických buněk v mitochondriích, enzymy účastníci se citrátového cyklu se z větší části vyskytují volně v mitochondriálním matrixu, některé jsou zakotvené k vnitřnímu povrchu vnitřní membrány [7].

2.1.3 Význam a funkce sukcinátu v organismu

Sukcinát zaujímá klíčovou pozici v metabolismu jako přímé spojení citrátového cyklu a mitochondriálního dýchacího řetězce i jako signální molekula.

Účastní se také velkého množství dalších procesů, ať už fyziologických nebo patologických [8]. Příkladem je ischemie, tedy situace, kdy je tkáň nedostatečně prokrvená, nenachází se v ní dostatek kyslíku pro správnou funkci metabolismu a dochází tedy k hypoxii. Konkrétně se může jednat jak o akutní stavy, například infarkt myokardu a plicní embolii, tak o další onemocnění, například ischemickou chorobu dolních končetin. Fyziologicky dochází k ischemii a následnému odumírání tkáně například během ischemické fáze menstruačního cyklu.

Nedostatek kyslíku nedovoluje správnou funkci dýchacího řetězce, dochází k jeho inhibici a tím jak k celkovému narušení metabolismu a životaschopnosti buňky, tak k hromadění sukcinátu. Zároveň dochází k rozpadu sukcinyl-CoA, čímž koncentrace sukcinátu v mitochondriálním matrixu dále stoupá a to celkem až 12x z hodnoty kolem 0,5 mM až na 6 mM [9] [3].

Poškození ischemické tkáně je způsobeno několika mechanismy podporujícími produkci reaktivních forem kyslíku (peroxid vodíku, superoxidy, hydroxylové radikály) a celkově prozánětlivým působením sukcinátu, jehož množství v tkáni narůstá během tvorby reaktivních forem kyslíku mitochondriálním dýchacím řetězcem. Následný návrat kyslíku produkci reaktivních forem kyslíku dále podporuje, dochází k rychlé oxidaci sukcinátu, vyčerpání CoQ a polarizaci vnitřní membrány mitochondrií [9] [10]. Oxidace sukcinátu vyvolává produkci prozánětlivých faktorů, například IL1 beta a zároveň potlačuje tvorbu protizánětlivých faktorů [11] [13].

Právě akumulace sukcinátu hraje důležitou roli při vzniku takzvaného reperfusního poškození tkáně, ke kterému dochází po návratu kyslíku do dříve ischemické tkáně, konkrétně například při infarktu myokardu [13].

Některé mechanismy se stejným způsobem jako při hypoxii uplatňují během zánětu nezávisle na tom, zda se ve tkáni nachází dostatek kyslíku nebo ne [8]. Buňky imunitního systému reagují na měnící se podmínky změnou metabolismu. Sukcinát se během zánětu hromadí v makrofázích [12]. Na akumulaci sukcinátu se může podílet některý z následujících mechanismů, případně i několik z nich zároveň. Patří mezi ně snížená aktivita enzymu sukcinát dehydrogenázy, buď kvůli celkovému poklesu oxidativní fosforylace, nebo kvůli inhibici itakonátem. Dále se uplatňují anaplerotické reakce, tedy reakce vytvářející meziprodukty citrátového cyklu. Konkrétně zvýšení metabolismu glutaminu má za následek tvorbu alfa-ketoglutarátu [14] [12]. K tvorbě sukcinátu

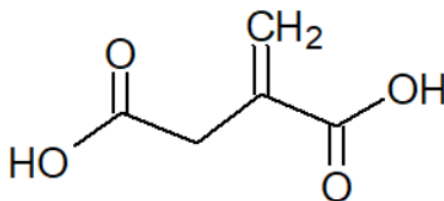
v makrofázích vedou i některé další metabolické dráhy, například metabolismus kyseliny gama-aminomáselné [3].

V mitochondriích dochází k sukcinátem podpořené tvorbě reaktivních forem kyslíku, které se kromě přímého poškození buněk peroxidací lipidů dále chovají jako prozánětlivý redoxní signál transkripčnímu faktoru HIF1 alfa (hypoxií indukovaný transkripční faktor 1 alfa). Sukcinát zároveň podporuje zvýšení koncentrace HIF1 alfa i dalšími mechanismy [15]. Vysoká koncentrace sukcinátu potlačuje funkci některých enzymů, mezi které patří i prolyl-hydroxylasy, které HIF1 alfa regulují [8] [15]. Nejen, že se tedy HIF1 alfa hromadí, ale zároveň ani nedochází k jeho správné regulaci a dostatečné degradaci, což má dlouhodobý vliv na genovou expresi. Konkrétně je podpořena exprese anti-hypoxických genů [8]. HIF1 alfa dále ovlivňuje vývoj T buněk imunitního systému, tlumí jejich regulační vývoj a podporuje jejich diferenciaci na prozánětlivé buňky Th17 [16].

Ve správně fungujících mitochondriích se za fyziologických podmínek reaktivní formy kyslíku nehromadí, ale jsou mnoha mechanismy eliminovány. Je zajímavé, že v malé míře se na eliminaci reaktivních forem kyslíku a ochraně mitochondrií podílí i sukcinát a enzym sukcinát dehydrogenáza [3].

Podle nedávného výzkumu z roku 2018 může sukcinát hrát roli prozánětlivého mediátoru i při roztroušené skleróze, kdy takto působí v centrálním nervovém systému [17].

Látka, která svým signálním působením potlačuje prozánětlivý efekt sukcinátu je již jednou zmíněný aniont kyseliny itakonové (obrázek 2) itakonát, molekula odvozená od intermediátu citrátového cyklu cis-akoniátu [18].



Obrázek 2: Strukturní vzorec kyseliny itakonové

Množství sukcinátu v buňkách stoupá nad běžné hodnoty i během hladovění nebo ketogenních diet, pokud obojí vede ke ketóze. Při katabolismu ketolátek je sukcinyl-CoA

využit jako donor CoA. Nárůst koncentrace sukcinátu vede i v této situaci k vzrůstu množství HIF1 alfa. Zároveň je produktovou inhibicí snižováno využití ketolátek, což se projeví obzvláště výrazně, pokud souběžně s ketózou dojde ve tkáni k hypoxii [3].

Hromadící se sukcinát může ukazovat i na některá dědičná nebo méně častá onemocnění, obvykle taková, která jsou způsobena mutací genů kódujících podjednotky enzymu sukcinát-dehydrogenasy. Některé tyto mutace způsobují nádorová onemocnění nebo zvyšují pravděpodobnost jejich výskytu, jedná se především o vzácné neuroendokrinní nádory, případně nádory sítnice nebo trávicí soustavy. Akumulace sukcinátu jako onkometabolitu je v tomto případě natolik masivní, že lze využít jako spolehlivý a specifický tumorový marker [19]. Geny kódující podjednotky sukcinát dehydrogenasy totiž zároveň působí jako tumor supresorové geny [3] [19]. U pacientů s nedostatečnou funkcí sukcinát-dehydrogenasy se může vyskytovat hyperamonémie a hypoglykémie, protože místo fyziologického využití sukcinátu v citrátovém cyklu dochází k zapojení dalších drah a hromadění sekundárních metabolitů. Vznikající propionyl-CoA a methylmalonyl-CoA inhibují některé kroky v močovinovém cyklu [3].

Inhibice funkce sukcinát-dehydrogenasy nebo narušení struktury některé z jejích podjednotek může způsobit smrt buňky řízenou apoptózou [20] [21].

Pokud v organismu dochází k sepsi, narůstá koncentrace sukcinátu v poškozené tkáni. Nárůst je obzvláště znatelný v pozdějších stádiích, což může pomoci odhadnout prognózu pacienta [4].

Působení sukcinátu jako signální molekuly v cytosolu spočívá v první řadě v utlumení funkce enzymů, které produkují sukcinát jako produkt. Jedná se tedy o produktovou inhibici. Mezi tyto enzymy patří například 2-oxoglutarát dependentní dioxygenasy [22]. Druhým příkladem signální funkce sukcinátu uvnitř buněk je již výše zmíněná inhibice prolyl-hydroxylas vedoucí k nárůstu koncentrace HIF1 alfa [8].

V extracelulárním prostoru má sukcinát signální funkci podobnou hormonům, působí na široké spektrum tkání a buněk, například na srdce, ledviny, tukovou tkáň, sítnici a buňky imunitního systému [23].

Sukcinát se dále uplatňuje i při metabolismu hemu, který využívá sukcinyl-CoA, který může vznikat ze sukcinátu opačnou reakcí, než která probíhá v citrátovém cyklu [24].

2.1.4 Další sledované parametry

Organické kyseliny obecně patří mezi často sledované parametry širokého spektra abnormalit. Jejich zvýšená koncentrace v séru, případně moči, může ukazovat například na některé nádory, vrozené poruchy metabolismu, poruchy endokrinního systému, nedostatek některého vitamínu nebo onemocnění jater či ledvin [25]. Během výše zmíněných patologických situací lze jako markery využít i mnohé další látky.

Kromě zvýšené koncentrace sukcinátu je možné během hypoxie detekovat i zvýšenou hladinu laktátu, protože bez dostatku kyslíku buňka více využívá anaerobní metabolismus. Stejně jako v případě sukcinátu, i hladina laktátu je do jisté míry úměrná vážnosti stavu pacienta [26].

Během zánětu dochází k produkci celé řady sloučenin, mezi které patří například signální molekuly cytokiny a chemokiny. Proteiny akutní fáze zánětu, které jsou tvořené především v játrech, jsou běžně sledovanými markery zánětu. Konkrétně jde o C-reaktivní protein, ceruloplasmin, alfa-2-makroglobulin, amyloidy A a P, haptoglobin a další, například koagulační proteiny [27].

Pro sledování přítomnosti a především vývoje a prognózy některých typů nádorových onemocnění lze využít nádorové markery. Jde o látky, které nádorové buňky produkují ve zvýšeném množství, obvykle jde o různé antigeny, enzymy nebo hormony. Patří mezi ně například alfa-1-fetoprotein, ukazující na nádory jater [28], tumorový antigen močového měchýře [29] nebo hormon kalcitonin, jehož hladina může být výrazně zvýšená při nádorovém onemocnění štítné žlázy [30].

2.2 Metody stanovení sukcinátu

Pro separaci a analýzu organických kyselin obsažených v lidském těle, mezi které patří i kyselina jantarová, lze mimo jiné použít kapalinovou (LC) nebo plynovou (GC) chromatografii [4] [31]. Analýza pomocí HPLC je obvykle časově i technicky méně náročná, ale na rozdíl od plynové chromatografie, která zvládne pojmout i vzorky s poměrně širokým spektrem organických kyselin, je kapalinová chromatografie vhodná při analýze spíše jedné nebo jen několika málo organických kyselin zároveň. Pro separaci organických kyselin pomocí HPLC je stejně jako ve většině dalších případů nejčastěji zvolen mód s reverzními fázemi [25]. V tomto případě se používají chromatografické kolony obsahující nepolární či mírně polární stacionární fázi, nejčastěji chemicky upravený silikagel s navázanými oktadecylovými nebo jinými skupinami. Mobilní fáze je vždy polární a skládá se obvykle ze dvou složek, z vody a polárního ve vodě rozpustného rozpouštědla, například acetonitrilu, methanolu nebo tetrahydrofuranu [32].

Detektory používané v HPLC jsou například UV detektory, elektrochemické a fluorescenční detektory. Pro GC lze použít například plamenový ionizační detektor [25]. Obě zmíněné chromatografické metody je výhodné propojit s hmotnostní spektrometrií (MS), dostaneme tak informace o molekulových hmotnostech, struktuře látek a je tak možné případné neznámé látky identifikovat [32] [4] [31].

Před separací většiny organických kyselin pomocí HPLC není třeba tyto kyseliny upravovat [25]. V případě karboxylových kyselin s krátkým řetězcem však stanovení pomocí tradiční HPLC s reverzními fázemi komplikuje nedostatečná retence a dále při použití hmotnostního spektrometru s ionizací elektrosprejem (ESI) i nedostatečná citlivost metody kvůli nízké efektivitě ionizace. Pro stanovení těchto látek včetně kyseliny jantarové a potažmo jejího aniontu sukcinátu je tedy nutné aplikovat vhodnou metodu derivatizace [33].

Další metody, pomocí kterých je možné stanovit či detekovat sukcinát zahrnují i metody aplikovatelné in vivo, konkrétně se jedná o nukleární magnetickou rezonanci. Je tak možné sukcinát detekovat jako tumorový marker [34].

2.3 Derivatizace

Derivatizace je chemická technika, při které je chemická sloučenina podrobena reakci a vzniká její derivát, sloučená s podobnou chemickou strukturou, ale s výhodnějšími vlastnostmi či chemickým složením. Tyto pozměněné vlastnosti zahrnují rozpustnost, reaktivitu, bod varu, bod tání a mnohé další.

V kapalinové chromatografii lze derivatizační přístupy rozdělit na tři hlavní podle místa, kde probíhá derivatizační reakce. Buď probíhá před chromatografickou kolonou, přímo na koloně nebo až za kolonou, každý způsob má odlišné požadavky na průběh reakce a vznikající deriváty. Například reakce za kolonou musí probíhat na rozdíl od předkolonové derivatizace velmi rychle, což může vést k vyšším nákladům na realizaci, zároveň ale taková reakce může probíhat i za extrémních podmínek a výsledný derivát nemusí být tolik stabilní. V kapalinové chromatografii a separačních technikách obecně je derivatizace využívána pro zvýšení citlivosti či vůbec pro umožnění detekce, pro umožnění separace, zlepšení rozlišení a pro zvýšení účinnosti [35]. V hmotnostní spektrometrii je třeba dbát především na to, aby kromě dostatečné citlivosti při použití zvolené metody derivát dovoľoval jeho efektivní ionizaci, případně aby docházelo k fragmentaci pro tandemovou hmotnostní spektrometrii [33] [31]. Použitím vhodných reagentů a aplikováním potřebných postupů můžeme z původního analytu vytvořit produkt, který má vhodnější fyzikální i chemické vlastnosti. Dochází ke zvýšení citlivosti dané metody a k požadovanému zvýšení retence, což je obzvlášť potřeba, jak již bylo zmíněno výše, právě při analýze LC-MS karboxylových kyselin s krátkým řetězcem včetně kyseliny jantarové, potažmo sukcinátu [33].

Při derivatizaci dochází k esterifikaci karboxylové skupiny nabitou skupinou nebo jejím prekurzorem, což má za následek mimo jiné vznik silného iontu při ionizaci APCI nebo ESI. Touto esterifikací vnikají methylestery, benzylestery nebo další estery, často reaguje alkohol s karboxylovou skupinou za přítomnosti kyselého katalyzátoru [36].

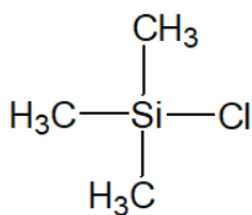
Převod karboxylových kyselin na methylestery je dobře známá metoda derivatizace, je používána spíše při GC-MS, probíhá za nekomplikovaných podmínek, často pouze v jednom kroku [31]. Methylestery karboxylových kyselin lze připravit například přidávkou diazomethanu nebo methyl jodidu [31] [37]. V případě kyselin jantarové nebo šťavelové nejde o optimální metodu pro HPLC-MS, protože nedojde k dostatečnému zvýšení citlivosti a ani kapacitního faktoru při HPLC s reverzními fázemi [31].

Pro analýzu organických kyselin bylo vyvinuto nespočet metod derivatizace. Řadí se mezi ně například tvorba dimethylaminoethyl esterů a trimethylaminoethyl esterů, jež lze s úspěchem použít obzvlášť při analýze mastných kyselin a jejich derivátů [38]. Použití kvartérních amoniových sloučenin však bývá problémové v případě dikarboxylových kyselin s krátkým řetězcem, takový derivát totiž s největší pravděpodobností vůbec nebude detekován při analýze ESI-MS [36]. Toto bylo potvrzeno i při testování použití derivátů pyridiniových sloučenin jako kvartérních solí [39].

Dále je při analýze organických kyselin, především mastných kyselin a jejich metabolitů využíváno například reakcí s kyselinou sulfanilovou nebo jejích derivátů v přítomnosti karbodiimidu EDC (1-ethyl-3-dimethylaminopropyl karbodiimid) [40]. Karbodiimidy, často konkrétně EDC, se využívají pro větší množství derivatizací [33]. Například 4-APEBA ((2-(4-aminophenoxy)ethyl)(4-bromophenethyl)-dimethylammonium bromid) v jeho přítomnosti zvyšuje citlivost detekce karboxylových kyselin při LC-MS/MS a usnadňuje rozpoznání sloučenin díky specifickému izotopovému profilu bromu [41]. Stejně jako v případě kvartérních aminů však toto nelze s úspěchem aplikovat při analýze intermediátu citrátového cyklu včetně sukcinátu. Pokud totiž vzorek obsahuje více různých karboxylových kyselin nebo kyseliny s více karboxylovými skupinami, může dojít k vzniku několika různých produktů, mimo jiné kvůli vnitřním cyklizačním reakcím [33]. Tento zmíněný problém ale nenastane v případě, kdy je místo 4-APEBA použit například o-BHA (o-benzylhydroxylamin) [42]. V kombinaci s EDC je možné i použití MPEA (N-methyl 2-fenylethanamin), který je jakožto sekundární amin vhodný pro LC-MS analýzu intermediátů citrátového cyklu [41]. Použití EDC společně s dalším sekundárním aminem, 4-BNMA (4-brom-N-methylbenzylamin), nabízí mnoho výhod při analýze nejen intermediátů citrátového cyklu, jde totiž o kombinaci předchozích přístupů. Díky fenylové skupině lze dosáhnout zlepšení retence při LC s reverzními fázemi a zároveň k výhodné fragmentaci pro tandemové techniky hmotnostní spektrometrie. Izotopový profil bromu usnadňuje identifikaci, a pokud je třeba, umožňuje určit počet karboxylových skupin v neznámé molekule. Zároveň se jedná o reagent, který je komerčně dostupný a vytvořené deriváty jsou při teplotách od 4 do 20 °C poměrně stabilní [33].

Dalším z vhodných reagentů při derivatizačních reakcích týkajících se intermediátů citrátového cyklu je trimethylsilyl chlorid (TMS-Cl) (obrázek 3). Je také poměrně dobře

komerčně dostupný, manipulace s ním není náročná, pouze je citlivý na vlhkost. Při reakci s nadbytkem alkoholu dochází ke generování kyseliny chlorovodíkové in situ, což katalyzuje reakci s benzylalkoholem a rychlou konverzi na benzylester, vše v jednom kroku. Dochází k potřebnému poklesu polarity, což umožňuje následnou separaci na reverzní fázi a zároveň dochází ke zvýšení účinnosti ionizace elektrosprejem [31]. Tento konkrétní postup derivatizace byl použit v experimentální části. TMS-Cl lze použít i při derivatizačních reakcích pro GC MS [4].



Obrázek 3: Strukturní vzorec trimethylsilyl chloridu

2.4 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je významná analytická metoda pro stanovení poměru hmotnosti k náboji (m/z) molekul nebo jejich fragmentů. Pomocí této citlivé chemicko-fyzikální metody lze určit hmotnost částic a jejich elementární složení. Jde o destruktivní metodu, spotřeba vzorku je ale velmi malá. Organické i anorganické molekuly musí být nejprve převedeny na ionty.

Pro kvalitativní i kvantitativní analýzu je obzvlášť výhodné spojení plynové nebo kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Separace složek vzorku před samotnou detekcí hmotnostním spektrometrem dovozuje analýzu i velmi komplexních vzorků [43]. Zatímco plynová chromatografie se ve spojení s MS používá už od 50. let 20. století [44], propojení s kapalinovou chromatografií je technicky o něco náročnější a bylo vyvinuto později, protože je třeba analyt nejen ionizovat, ale i převést z kapalné do plynné fáze a vysokého vakua [32]. K tomuto účelu byly vyvinuty metody ionizace za atmosférického tlaku jako APCI a ESI [43]. Pro analýzu biochemických vzorků a vzorků biologického nebo environmentálního původu je v kombinaci s MS časté použití kapalinové chromatografie s reverzními fázemi [35].

2.4.1 Ionizace elektrosprejem

V současné době je ionizace elektrosprejem (ESI) nejběžněji používaný iontový zdroj u LC-MS, protože umožňuje převod nabitých iontů z kapalné fáze do plynné. Jde o měkký iontový zdroj, molekulám je udělena pouze malá zbytková energie, což vede k nižší míře fragmentace [43].

Ionizace elektrosprejem nalézá uplatnění mimo jiné v biologii, biomedicině a biochemii při analýze proteinů, nukleových kyselin a dalších molekul, například těch, které jsou součástí metabolismu léčiv [45].

2.4.2 Vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie

Vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie (HRMS) umožňuje detekci analytů s přesností vyšší než 1 mDa [45]. Mezi základní HRMS přístroje patří hybridní přístroj spojující kvadrupól a průletový analyzátor (QqTOF), magnetický sektorový analyzátor,

iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR) a v neposlední řadě orbitální past Orbitrap.

Vývoj, který vedl k FT-ICR začal v roce 1932, tato technika byla ale představena až v roce 1974 a od té doby docházelo a stále dochází k jejímu zlepšování [45] [46]. Od ostatních technik hmotnostní spektrometrie odlišuje FT-ICR to, že jsou ionty detekovány zároveň během detekčního intervalu, ne v různých časech nebo v různém místě. Ionty vytvořené v magnetickém poli jsou odvedeny do Penningovy pasti, což je statická elektrická/magnetická iontová past. Ionty v magnetickém poli rotují a dochází k iontové cyklotronové rezonanci. Detektory měří elektrický signál iontů, které projdou v blízkosti detekčních destiček, nedochází ke přímému kontaktu s detektorem [45] [46] [47].

Rozlišení ve FT-ICR MS může být zlepšeno použitím silnějšího magnetu nebo prodloužením detekčního intervalu [47]. Mezi výhody patří mimo jiné právě vysoké rozlišení a vysoká citlivost. Nedestruktivita této metody dovoluje další experimentování a použití tandemové hmotnostní spektrometrie [45].

Průletový analyzátor byl poprvé zkonstruován a představen v publikaci v roce 1946 [48]. Ionty jsou urychleny v elektrickém poli do vakuované trubice směrem k detektoru a jsou rozlišeny podle poměru m/z . Distribuce kinetické energie ve směru letu iontů je korigována pomocí iontového zrcadla, které odráží iontové paprsky konstantním elektrostatickým polem. Princip TOF spočívá v měření doby letu iontů s určitým potenciálem k detektoru po dráze známé délky. Vzhledem k tomu, že kinetická energie částic se stejným nábojem je totožná, závisí jejich rychlost na hmotnosti. Lehčí částice se tedy budou pohybovat rychleji a detektoru dosáhnou v kratším čase než těžší částice [48] [45]. Mezi výhody této metody patří například vysoká rychlost vytvoření kompletního spektra, vysoký, v principu neomezený rozsah m/z , vysoká citlivost a v porovnání s některými jinými technikami MS i nižší finanční náklady na konstrukci přístroje [45].

Počátek cesty vedoucí k Orbitrapu odstartoval vynález Kingdonovy iontové pasti v roce 1923, k dalšímu vývoji bylo zásadně přispěno až v roce 1981 [49] [50]. Konečný přístroj Orbitrap byl představen v devadesátých letech dvacátého století [51]. Orbitrap zachycuje ionty v elektrostatické orbitální iontové pasti, která se skládá z vnější barelovité elektrody a vnitřní centrální elektrody, kolem které ionty oscilují. K převodu na hmotnostní spektra využívá Fourierovu transformaci [52] [49].

2.4.3 Hybridní přístroje

Součástí konstrukce hmotnostního spektrometru mohou být kombinace různých typů hmotnostních analyzátorů, čímž vznikají takzvané hybridní přístroje, které nacházejí uplatnění především při spojení s měkkými ionizačními technikami při fragmentačních experimentech. Mezi tyto hybridní přístroje patří například komerčně velmi úspěšný kvadrupól s průletovým analyzátozem (QqTOF), dále kombinace iontové pasti s iontovou cyklotronovou rezonancí nebo kvadrupól s Orbitrapem [45] [49]. Velmi zajímavé jsou i kombinace tří typů hmotnostně spektrometrických technik, jejichž využití dokáže nabídnout například Orbitrap Fusion, kde je kvadrupól s Orbitrapem doplněn ještě lineární iontovou pastí [53].

Princip QqTOF spočívá ve spojení trojnásobného kvadrupólového hmotnostního analyzátoru s průletovým analyzátozem, který nahrazuje třetí kvadrupól. V porovnání s kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem nabízí takové uspořádání vyšší selektivitu díky přesnějšímu výběru fragmentů, na druhou stranu je ale analýza o něco pomalejší [54].

3 Experimentální část

3.1 Seznam použitých chemikálií

Byly použity následující chemikálie, v závorce je uvedena čistota a dodavatel:

kyselina jantarová (99 %, Lachema, Brno ČR)

kyselina šťavelová (99 %, Lachema, Brno ČR)

kyselina mravenčí (98 %, Lach-Ner, Neratovice, ČR)

methanol (čistota pro HPLC, Lach-Ner, Neratovice, ČR)

TMS-Cl (99 %, Sigma Aldrich Gillingham, Dorset, UK)

benzylalkohol (99,8 %, Sigma Aldrich Gillingham, Dorset, UK)

acetonitril (čistota pro HPLC, Fisher Scientific, Loughborough, UK)

destilovaná voda

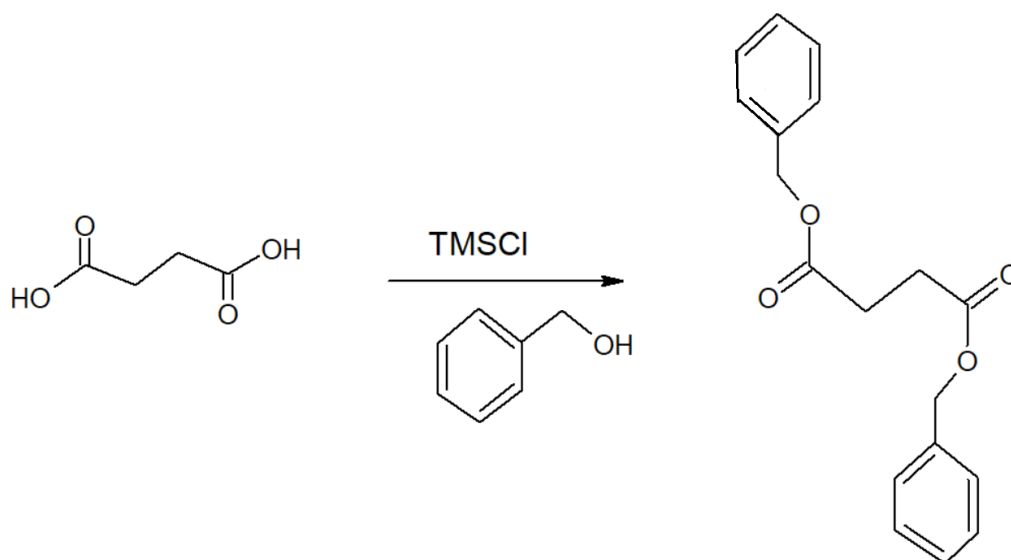
3.2 Přístroje, programy

Pevné sloučeniny byly naváženy pomocí analytických vah Kern ALJ 220-4 (Kern & Sohn, Německo). Pro provedení derivatizační reakce byla použita ultrazvuková lázeň Sonorex (Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Německo). Kapalinová chromatografie byla provedena na přístroji HP1100 s DAD detektorem, přístroj byl ovládaný pomocí programu Compass HyStar 3.2 (Bruker Daltonics, Německo). Použita byla kolona Supelcosil LC-18 150x3 mm 3 μ m Col:14148-019. Hmotnostní spektra byla získána pomocí hmotnostního spektrometru Bruker QqTOF compact ovládaného pomocí programu Compass otofControl 4.0 (Build 60.11) a kalibrovaného roztokem mravenčanu sodného. Následné vyhodnocení spekter bylo provedeno v programech Compass DataAnalysis 4.4 (Build 200.55.2969) a IsotopePattern (Bruker Daltonics, Německo).

Molekulární a strukturní vzorce a teoretické hmoty sloučenin byly získány v programech ChemSketch (ACD labs, Kanada) a IsotopePattern (Bruker Daltonics, Německo).

3.3 Postup

Pro přípravu roztoků a postup derivatizace byl použit modifikovaný postup podle publikace [55]. Bylo připraveno 5 ml 10mM kyseliny jantarové v methanolu a 5 ml 5mM kyseliny šťavelové v methanolu. Bylo připraveno 500 ml 10mM mravenčanového pufru o pH 3,5. Do vialky bylo přeneseno 10 μ l roztoku kyseliny jantarové a 10 μ l roztoku kyseliny šťavelové. Roztok byl vysušen pod argonem. Dále bylo přidáno 50 μ l benzylalkoholu a 30 μ l trimethylsilyl chloridu. Uzavřená vialka s roztokem byla podrobena ultrazvukové lázni, 30 minut za pokojové teploty a 30 minut za teploty 80 °C. Schéma derivatizační reakce a vzorec vzniklého dibenzyl sukcinátu je na obrázku 4. Objem ve vialce byl následně doplněn na 0,5 ml přídatkem acetonitrilu. Dále byla provedena LC-ESI/HRMS analýza připraveného vzorku.



Obrázek 4: Schéma derivatizační reakce

3.4 Podmínky měření

Kapalinová chromatografie byla provedena za následujících podmínek:

mobilní fáze A (20 %): mravenčanový pufr o pH 3,5

mobilní fáze B (80 %): acetonitril

délka analýzy: 15 minut

průtoková rychlost: $0,43 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$

nástřik: $10 \text{ } \mu\text{l}$

teplota kolony: $25 \text{ } ^\circ\text{C}$

DAD detektor měřil v rozsahu: 190-400 nm

Hmotnostní spektra byla naměřena za těchto podmínek:

iontová polarita: pozitivní

typ iontového zdroje: elektrosprej

začátek skenování: 50 m/z

konec skenování 1000 m/z

tlak zmlžovače: 0,4 bar

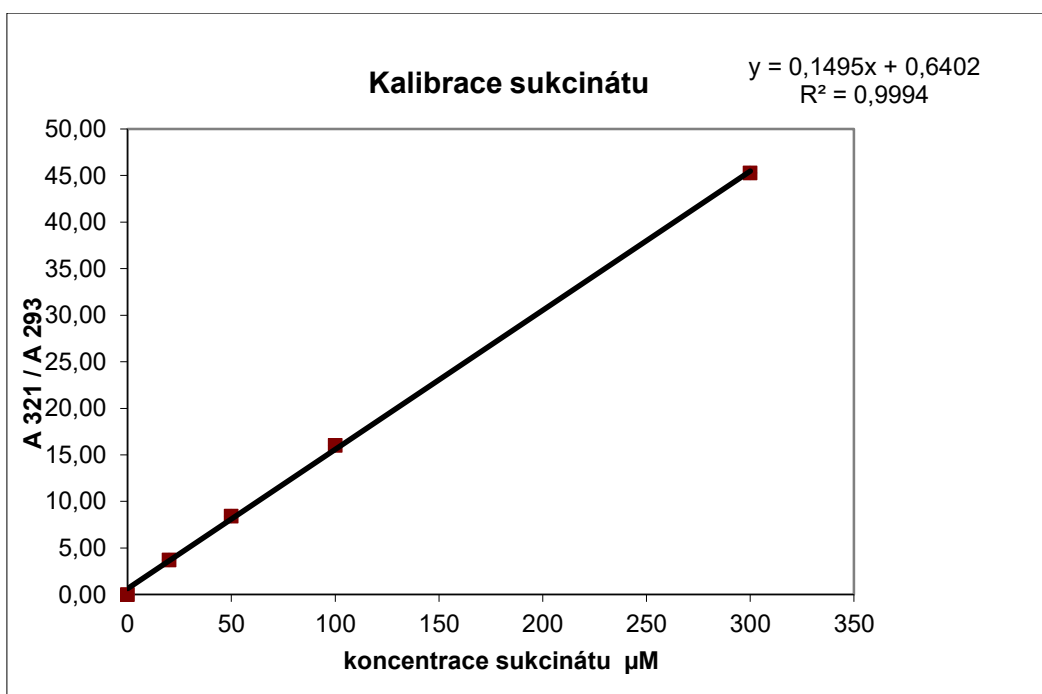
teplota sušícího plynu: $280 \text{ } ^\circ\text{C}$

průtok sušícího plynu: $4,0 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$

napětí na kapiláře: 4500 V

4 Výsledky a diskuze

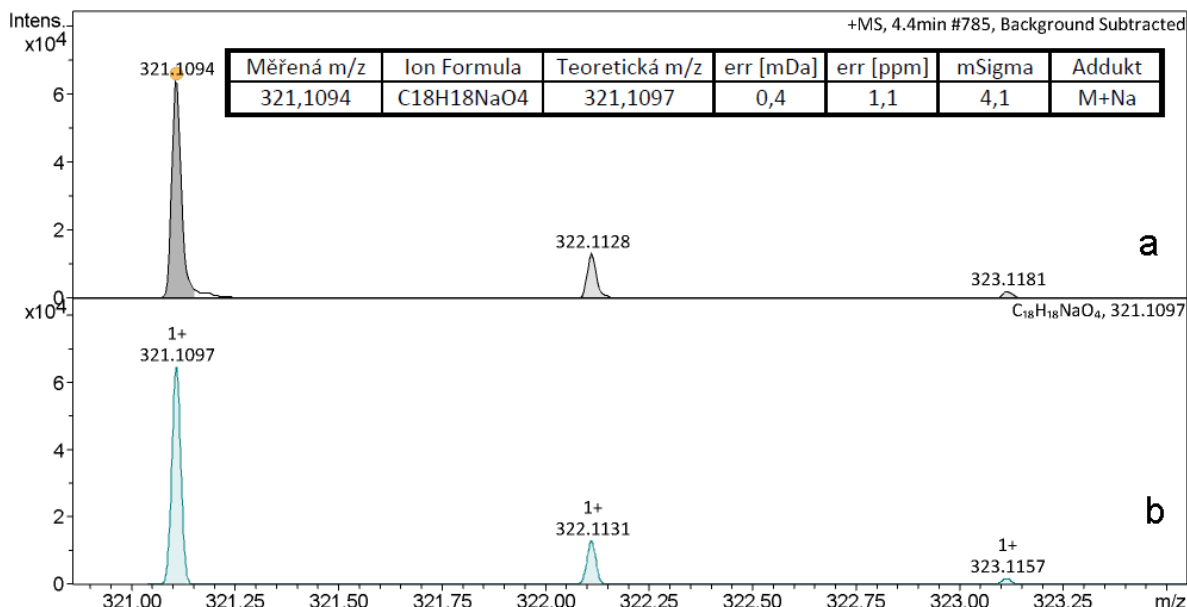
Ve své práci jsem se zabývala studiem analytické metody pro stanovení velmi nízkých intracelulárních koncentrací sukcinátu pomocí LC-ESI/HRMS. Použitá metoda je založená na katalytické esterifikaci kyseliny jantarové benzylalkoholem v přítomnosti TMS - chloridu za zvýšené teploty. Mechanismus optimalizované derivatizace je prezentován v experimentální části, neboť nebyl předmětem studia. Pro stanovení byla použita metoda kalibrace s vnitřním standardem dibenzylesterem kyseliny šťavelové, který poskytoval molekulární adukt se sodíkem m/z 293. Byla získána pětibodová lineární kalibrační závislost (zobrazená na obrázku 5) v koncentračním rozsahu do $300 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ s korelačním koeficientem $R^2 = 0,9994$.



Obrázek 5: Závislost odezvy MS detektoru na koncentraci sukcinátu

Použitá derivatizace jednoznačně přináší mnoho výhod, jako je možnost separace na reverzní fázi, zvýšení selektivity a citlivosti stanovení a v neposlední řadě také možnost kombinace hmotnostního a DAD detektoru. Vzhledem k tomu, že jsem ve své práci měla k dispozici hmotnostní detektor s vysokou rozlišovací schopností, byla identifikace píků standardů prakticky jednoznačná. Na obrázku 6 je zachycen naměřený HRMS izotopový profil sodíkového aduktu dibenzylsukcinátu (a) v porovnání s teoreticky kalkulovaným

obrazem (b). Z obrázku a přiložené tabulky je zřejmá vysoká shoda mezi naměřenými a teoretickými hodnotami a dosažená chyba je menší než 0,5 mDa. Hodnota parametru mSigma menší než 5 deklaruje vynikající shodu izotopových profilů.

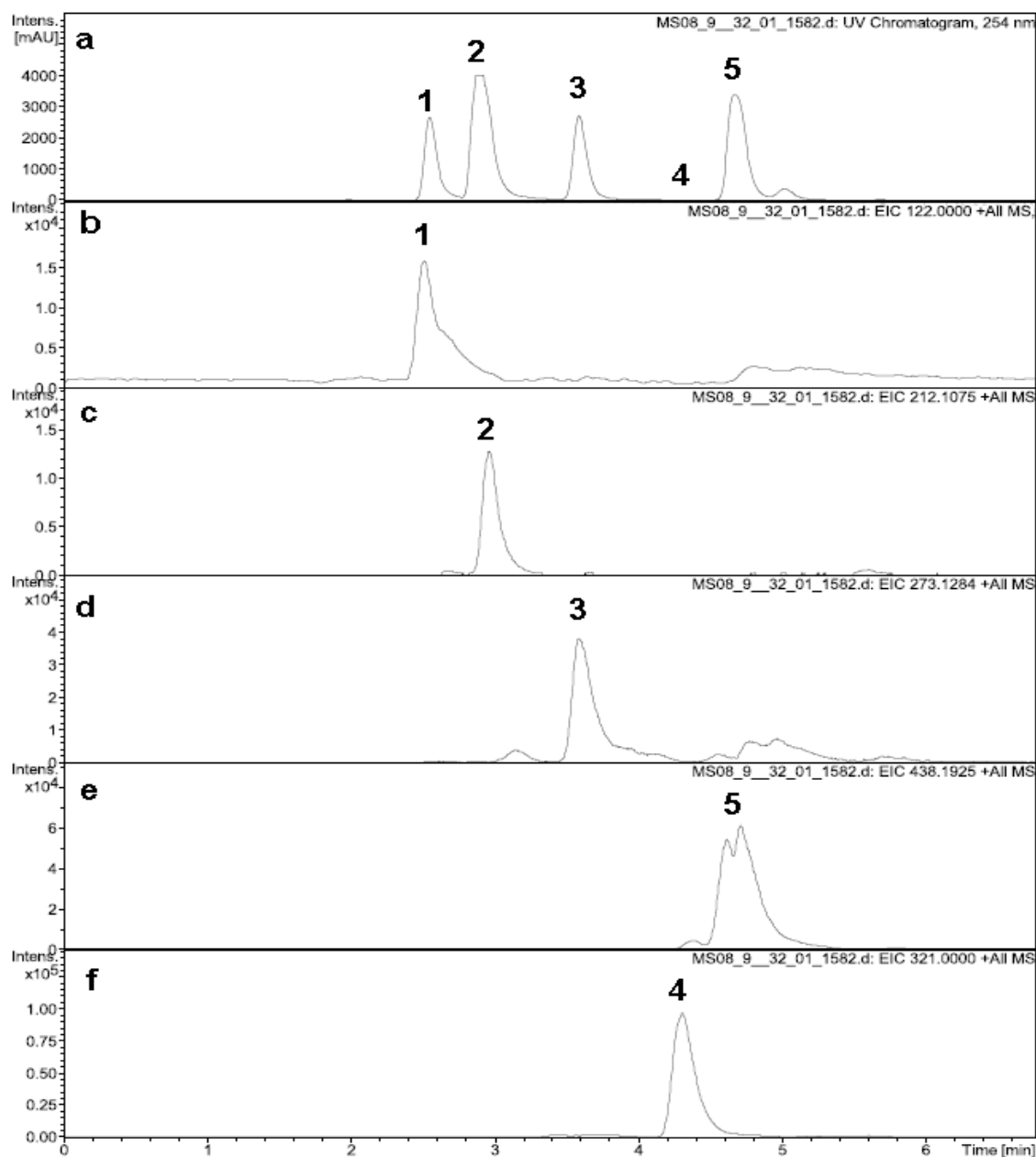


Obrázek 6: Naměřený HRMS izotopový profil (a) dibenzylsukcinátu v porovnání s teorií (b)

Benzyl estery byly separovány pomocí chromatografie s reverzními fázemi. Podrobné podmínky separace jsou uvedeny v experimentální části. Jak je patrné z obrázku 7, všechny složky separované směsi byly eluovány mezi 2 – 5 minutou. Konkrétní retenční časy jsou shrnuty v tabulce 1. Z tabulky a chromatogramu je patrné, že stanovované analyty dibenzyl sukcinát a dibenzyl oxalát jsou eluovány odděleně v krátkém intervalu mezi 3,6 a 4,7 minutou. Zejména první tři píky a také pátý pík chromatogramu se eluují ve vysokých koncentracích a proto je nutné tyto píky odklonit do odpadu, aby se tak předešlo kontaminaci iontového zdroje. Ve své práci jsem se pokusila balastní píky pocházející převážně z benzyl alkoholu a TMS-Cl identifikovat, nebo alespoň pomocí měření přesných hmot a využití programu Smart Formula odhadnout elementární složení neznámých látek. Iontový chromatogram (f) představuje eluci stanovovaného derivátu kyseliny jantarové.

Je pravděpodobné, že při esterifikaci benzylalkoholem v přítomnosti TMS-Cl vzniká celá řada vedlejších produktů. Z hmotnostních spekter vyplývá, že by se mohlo jednat

o oxidační produkty benzylalkoholu a další kyslíkaté látky. Jak se ale ukázalo, je možné optimalizací separačních podmínek dosáhnout takového stavu, kdy jsou nežádoucí vlivy balastních látek prakticky eliminovány.

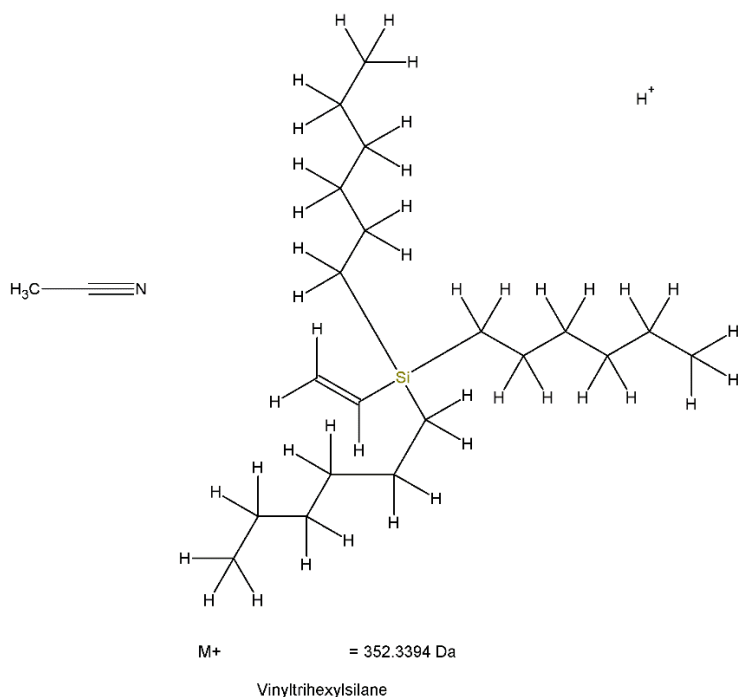


Obrázek 7: Chromatogram UV (a) při vlnové délce 254 nm a iontové chromatogramy (b-f) složek eluovaných v intervalu 0 – 7 minut.

č.	Rt (min)	vzorec	Měřená m/z	Teoretická m/z	Chyba (ppm)	Adukt ion
1	2.5	C ₅ H ₄ O	122.0598	122.0601	1.8	M+CH ₃ CN+H
2	3	C ₁₂ H ₁₀ O	212.1075	212.1071	-2.4	M+CH ₃ CN+H
3	3.6	C ₂₀ H ₁₆ O	273.1284	273.1274	-3.7	M+H
4	4.3	C ₁₈ H ₁₈ O ₄	321.1109	321.1097	-3.7	M+Na
5	4.7	C ₂₃ H ₂₄ O ₆	438.1925	438.1911	-3.2	M+CH ₃ CN+H
		C ₂₁ H ₂₈ O ₂ Si	363.1753	363.1751	-0.6	M+Na
		C ₁₅ H ₂₄ O ₃ Si	303.1389	303.1387	-0.7	M+Na
		C ₂₀ H ₄₃ Si	352.3393	352.3394	0.3	M+CH ₃ CN+H

Tabulka 1: Retenční časy a odhadované sumární vzorce eluovaných složek

Bohužel bylo ještě zjištěno, že během analýzy dochází k poškození stacionární fáze chromatografické kolony, což vede ke snižování životnosti kolony a také změnám separační účinnosti v průběhu měření. Tento proces degradace kolony je signalizován elucí některých některých látek obsahujících křemík. Přítomnost křemíku byla potvrzena měřením HRMS spekter. Eluce těchto látek se může nepravidelně opakovat a z tohoto důvodu není těmto píkům přiřazen retenční čas. Jednou z hlavních složek této skupiny látek by mohl být vinyltrihexylsilan C₂₀ H₄₃ Si, který tvoří adukt s acetonitrilem za vzniku iontu m/z 352,3394, který je na obrázku 8.



Obrázek 8: Struktura aduktu vinyltrihexylsilanu s acetonitrilem

Za hlavní příčinu destabilizace stacionární fáze u C18 kolon může být to, že nezreagovaný TMS-Cl snadno reaguje s nukleofily, přičemž je z jeho molekuly odstraněna chloridová skupina. Pokud je nukleofilem voda, dochází k hydrolýze za vzniku hexamethyldisiloxanu a chlorovodíku, který tak může chromatografickou kolonu poškozovat [56].

5 Závěr

Byla optimalizována citlivá metoda pro stanovení kyseliny jantarové v biologických vzorcích pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem. Podařilo se eliminovat vlivy balastních látek. Byla získána pětibodová lineární kalibrační závislost pro stanovení kyseliny jantarové v koncentračním rozsahu do $300 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ s korelačním koeficientem $R^2 = 0,9994$.

Zároveň bylo zjištěno, že během analýzy dochází k poškození stacionární fáze chromatografické kolony, což vede ke snižování životnosti kolony a také změnám separační účinnosti v průběhu měření.

6 Použitá literatura

- [1] Sigma Aldrich: *Succinic acid – Product information sheet*. dostupné na: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Product_Information_Sheet/398055pis.pdf (cit. 6.1.2020)
- [2] Yin, X. et al.: Metabolic engineering in the biotechnological production of organic acids in the tricarboxylic acid cycle of microorganisms: Advances and prospects. *Biotechnology advances* 33:6, 830-841 (2015)
- [3] Tretter, L.; Patocs, A.; Chinopoulos, C.: Succinate, an intermediate in metabolism, signal transduction, ROS, hypoxia, and tumorigenesis. *Bioenergetics* 1857:8, 1086-1101 (2016)
- [4] Beloborodova, N. et al.: Serum Levels of Mitochondrial and Microbial Metabolites Reflect Mitochondrial Dysfunction in Different Stages of Sepsis. *Metabolites* 9:10, 196 (2019)
- [5] Kubišta, V.: *Buněčné základy životních dějů*. Praha, Scientia 1998
- [6] Benda, V.; Babůrek, I.; Kotrba, P.: *Základy biologie*. Praha, Vysoká škola chemicko-technologická 2005
- [7] Kodíček, M.; Valentová, O.; Hynek, R.: *Biochemie – chemický pohled na biologický svět*. 2. vydání, Praha, Vysoká škola chemicko-technologická 2018
- [8] Murphy, M. P.; O'Neill, L. A. J.: Krebs Cycle Reimagined: The Emerging Roles of Succinate and Itaconate as Signal Transducers. *Cell* 174:4, 780-784 (2018)
- [9] Chouchani, E. T. et al.: Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* 515, 431-435 (2014)
- [10] Chouchani, E. T. et al.: A Unifying Mechanism for Mitochondrial Superoxide Production during Ischemia-Reperfusion Injury. *Cell Metabolism* 23:2, 254-263 (2016)
- [11] Mills, E.; O'Neill, L. A. J.: Succinate: a metabolic signal in inflammation. *Trends in Cell Biology* 24:5, 313-320 (2014)
- [12] Tannahill, A. M. et al.: Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1beta through HIF-1alpha. *Nature* 496, 238-242 (2013)
- [13] Mills, E. L.; Pierce, K. A.; Jedrychowski, M. P. et al.: Accumulation of succinate controls activation of adipose tissue thermogenesis. *Nature* 560, 102–106 (2018)
- [14] Krawczyk, C. M. et al.: Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood* 115, 4742-4749 (2010)
- [15] Kuschel, A.; Simon, P.; Tug, S.: Functional regulation of HIF-1alpha under normoxia-is there more than post-translational regulation? *Cellular Physiology* 227, 514-524 (2012)

- [16] Dang, E. V. et al.: Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell* 146, 772-784 (2011)
- [17] Peruzzotti-Jametti, L. et al.: Macrophage-derived extracellular succinate licenses neural stem cells to suppress chronic neuroinflammation. *Stem Cell* 22, 355-368 (2018)
- [18] Lampropoulou, V. et al.: Itaconate links inhibition of succinate dehydrogenase with macrophage metabolic remodeling and regulation of inflammation. *Cell Metabolism* 24, 158–166 (2016)
- [19] Lussey-Lepoutre, C. et al.: In Vivo Detection of Succinate by Magnetic Resonance Spectroscopy as a Hallmark of SDHx Mutations in Paraganglioma. *Clinical Cancer Research* 22:5, 1120-1129 (2015)
- [20] Kluckova, K. et al.: Ubiquinone-binding site mutagenesis reveals the role of mitochondrial complex II in cell death initiation. *Cell Death & Disease* 6:5, 1749 (2015)
- [21] Grimm, S.: Respiratory chain complex II as general sensor for apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1827:5, 565–572 (2013)
- [22] Loenarz, C.; Schofield, C. J.: Physiological and biochemical aspects of hydroxylations and demethylations catalyzed by human 2-oxoglutarate oxygenases. *Trends in Biochemical Sciences* 36, 7–18 (2011)
- [23] De Castro Fonesca, M. et al.: GPR91: expanding the frontiers of Krebs cycle intermediates. *Cell Communication and Signaling* 14, 3 (2016)
- [24] Frezza, C. et al.: Haem oxygenase is synthetically lethal with the tumour suppressor fumarate hydratase. *Nature* 477, 225-228 (2011)
- [25] Henschen, A. et al.: *High Performance Liquid Chromatography in Biochemistry*. Weinheim Německo, VCH 1985
- [26] Kluckow, M.; Seri, I.: *Clinical Presentations of Neonatal Shock. Hemodynamics and Cardiology: Neonatology Questions and Controversies*, 2. vydání, Saunders Nizozemsko, Elsevier 2012
- [27] Germolec, D. R., et al.: Markers of Inflammation. *Immunotoxicity Testing* 57–79 (2018)
- [28] Yamashita, T. et al.: Gd-EOB-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging and alpha-fetoprotein predict prognosis of early-stage hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 60:5, 1674–1685 (2014)
- [29] D’Costa, J. J. et al.: A Systematic Review of the Diagnostic and Prognostic Value of Urinary Protein Biomarkers in Urothelial Bladder Cancer. *Bladder Cancer* 2:3, 301–317 (2016)

- [30] Camacho, C. P. et al.: Measurement of Calcitonin and Calcitonin Gene-Related Peptide mRNA Refines the Management of Patients with Medullary Thyroid Cancer and May Replace Calcitonin-Stimulation Tests. *Thyroid* 23:3, 308–316 (2013)
- [31] Jaitz, L. et al.: LC–MS analysis of low molecular weight organic acids derived from root exudation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 400:8, 2587–2596 (2010)
- [32] Kolektiv autorů: *Analýza organických látek*. Český Těšín, Theta 1999
- [33] Marquis, B. J. et al.: A New Derivatization Reagent for HPLC–MS Analysis of Biological Organic Acids. *Chromatographia* 80:12, 1723–1732 (2017)
- [34] Pollard, P.J. et al.: Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1alpha in tumours which result from germline FH and SDH mutations. *Human Molecular Genetics* 14, 2231–2239 (2005)
- [35] Nováková, L.; Douša, M. a kolektiv: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha, Europrint 2013
- [36] Johnson, D. W.: Contemporary clinical usage of LC/MS: Analysis of biologically important carboxylic acids. *Clinical Biochemistry* 38:4, 351–361 (2005)
- [37] Maurer, H. H.; Arlt, J. W.: Detection of 4-hydroxycoumarin anticoagulants and their metabolites in urine as part of a systematic toxicological analysis procedure for acidic drugs and poisons by gas chromatography–mass spectrometry after extractive methylation. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 714:2, 181–195 (1998)
- [38] Johnson, D. W.: Alkyldimethylaminoethyl ester iodides for improved analysis of fatty acids by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 14:21, 2019–2024 (2000)
- [39] Barry, S. J. et al.: Derivatisation for liquid chromatography/electrospray mass spectrometry: synthesis of pyridinium compounds and their amine and carboxylic acid derivatives. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 17:6, 603–620 (2003)
- [40] Yang, Y. et al.: Liquid chromatography/mass spectrometry with collision-induced dissociation of arachidonic acid metabolites derivatized with aminobenzenesulphonic acid. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 9:4, 289–299 (1995)
- [41] Kloos, D. et al.: Derivatization of the tricarboxylic acid cycle intermediates and analysis by online solid-phase extraction-liquid chromatography–mass spectrometry with positive-ion electrospray ionization. *Journal of Chromatography A* 1232, 19–26 (2012)
- [42] Tan, B. et al.: Derivatization of the tricarboxylic acid intermediates with O-benzylhydroxylamine for liquid chromatography–tandem mass spectrometry detection. *Analytical Biochemistry* 465, 134–147 (2014)

- [43] Kromidas, S.: *The HPLC-MS Handbook for Practitioners*. Weinheim Nemecko, Wiley-VCH 2017
- [44] Gohlke, R. S.; McLafferty, F. W.: Early gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 4:5, 367–371 (1993)
- [45] Gross, J. H.: *Mass Spectrometry*. Heidelberg Nemecko, Springer 2004
- [46] Marshall, A. G. et al.: Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: A primer. *Mass Spectrometry Reviews* 17:1, 1–35 (1998)
- [47] Marshall, A. G.; Hendrickson, C. L.: Fourier transform ion cyclotron resonance detection: principles and experimental configurations. *International Journal of Mass Spectrometry* 215:1, 59–75 (2002)
- [48] Stephens, W. E.: A pulsed mass spectrometer with time dispersion. *Physical Review* 69, 691 (1946)
- [49] Friedecký, D.; Lemr, K.: Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus* 20:41, 152–157 (2012)
- [50] Knight, R. D.: Storage of ions from laser-produced plasmas. *Applied Physics Letters* 38:4, 221–223 (1981)
- [51] Makarov, A.: Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis. *Analytical Chemistry* 72:6, 1156–1162 (2000)
- [52] Hu, Q. et al.: The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry* 40:4, 430–443 (2005)
- [53] Pragolab: *Orbital fusion*. dostupné na: <https://www.pragolab.cz/chromatografie-a-ms/hplc-ms/hybridni-systemy/orbitrap-fusion> (cit. 22.12.2019)
- [54] Steen, H.; Küster, B.; Mann, M.: Quadrupole time-of-flight versus triple-quadrupole mass spectrometry for the determination of phosphopeptides by precursor ion scanning. *Journal of Mass Spectrometry* 36:7, 782–790 (2001)
- [55] Rodríguez, A. et al.: A selective method for the preparation of aliphatic methyl esters in the presence of aromatic carboxylic acids. *Tetrahedron Letters* 39:47, 8563–8566 (1998)
- [56] Brook, M. A.: *Silicon in Organic, Organometallic, and Polymer Chemistry*. New York USA, John Wiley & Sons 2000